

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 844 052

(21) N° d'enregistrement national : 02 10663

(51) Int Cl<sup>7</sup> : G 01 N 33/487; C 12 M 1/34, G 01 N 33/50, 33/68

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 28.08.02.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 05.03.04 Bulletin 04/10.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR.

(72) Inventeur(s) : PICOLLET DAHAN NATHALIE, CAILLAT PATRICE, REVOL CAVALIER FREDERIC et CHATELAIN FRANCOIS.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : BREVATOME.

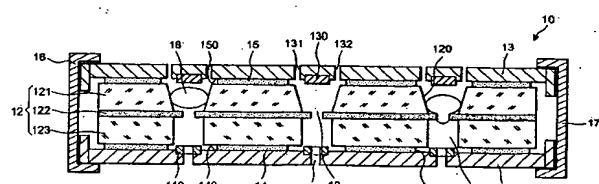
### (54) DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ELECTRIQUE D'ELEMENTS BILOGIQUES ET SES APPLICATIONS.

(57) L'invention se rapporte à un dispositif pour mesurer l'activité électrique d'éléments biologiques, comprenant un substrat (12) présentant au moins une ouverture (120) pour le logement d'un élément biologique (18), et caractérisé en ce que :

- il comprend deux plaques (11, 13) disposées de part et d'autre du substrat et munies chacune, sur leur face disposée en regard du substrat, d'au moins une électrode (110, 130) située en vis-à-vis de l'ouverture (120) du substrat (12);

- ces plaques et l'ouverture (120) du substrat (12) délimitent une chambre (19) qui est remplie, en condition d'utilisation du dispositif, d'un milieu liquide; et

- chacune des plaques (11, 13) disposées de part et d'autre du substrat (12) comporte au moins un canal prenant naissance dans ladite chambre et reliant cette dernière à l'extérieur dudit dispositif.



DISPOSITIF DE MESURE DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE  
D'ELEMENTS BIOLOGIQUES ET SES APPLICATIONS

DESCRIPTION

5

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte à un dispositif de mesure de l'activité électrique d'un ou plusieurs éléments biologiques, et plus spécialement à 10 un dispositif permettant de mesurer en parallèle l'activité électrique d'une pluralité d'éléments biologiques.

Elle se rapporte également aux applications de ce dispositif.

15 Dans ce qui précède et ce qui suit, on entend par "élément biologique", tout élément naturel ou artificiel dont au moins une partie est formée d'une membrane biologique ou reproduit les caractéristiques structurelles et/ou fonctionnelles d'une membrane 20 biologique.

Ainsi, il peut s'agir d'une cellule biologique entière ou d'un organelle de cellule biologique du type vacuole, appareil de golgi, mitochondrie, réticulum endoplasmique, lysosome, ..., d'un 25 fragment de membrane biologique, agrémenté ou non de parties cytosoliques, d'une bicouche lipidique artificielle tel qu'un film de phosphatidylcholine ou de phosphatidylglycérol, dotée d'un ou plusieurs pores protéiques, ou encore d'une membrane biomimétique.

30 La genèse et la transmission des signaux électriques présents dans les cellules biologiques est

sous la dépendance de protéines transmembranaires qui forment des pores dans l'épaisseur des membranes plasmiques et assurent le passage d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) au travers de ces membranes, d'où leur nom de canaux ioniques. La plupart de ces canaux ioniques s'ouvre en réponse à une perturbation spécifique de la membrane dans laquelle ils se trouvent et qui peut être liée, soit à un changement du potentiel électrique de cette membrane (on parle alors de canaux sensibles au voltage ou voltage dépendants), soit à la fixation d'un ligand sur un récepteur membranaire (on parle alors de récepteurs-canaux).

On sait aujourd'hui qu'un dysfonctionnement de certains canaux ioniques est impliqué dans des pathologies majeures parmi lesquelles on peut citer l'épilepsie, les myotonies, l'ataxie cérébro-spinale, l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, les arythmies comme le syndrome de quadriarythmie ventriculaire et le syndrome de Jervell et Lange Nielsen, la mucoviscidose, le diabète et certaines affections rénales comme les syndromes de Bartter et Gritelman et le pseudohypoaldestéronisme (PHDA) de type 1. De même, certains canaux ioniques apparaissent être impliqués dans la genèse et la régulation des messages nociceptifs qui sont à l'origine des douleurs aiguës et des douleurs chroniques.

Le dispositif selon l'invention est donc susceptible de constituer un outil de choix pour la recherche pharmaceutique, et notamment pour la réalisation d'études visant à mieux comprendre les mécanismes responsables au niveau cellulaire des

affections liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques, à identifier les sites et les modes d'action des médicaments déjà reconnus comme efficaces dans le traitement de ces affections et, à partir de là, à 5 développer de nouveaux médicaments plus actifs et plus spécifiques que ceux dont on dispose déjà.

En particulier, le dispositif selon l'invention peut trouver une application dans le domaine de la pharmacologie, pour l'étude d'antidotes, 10 de médicaments contre certains poisons ou venins, par exemple de scorpions), pour le criblage à moyen ou haut débit de molécules ayant pour cibles des canaux ioniques et pouvant, de ce fait, présenter un intérêt thérapeutique, ou de candidats médicaments afin 15 d'évaluer leurs effets et/ou leur toxicité, ainsi que dans le domaine de la pharmacovigilance.

Il peut également être utilisé pour le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques.

20 Par ailleurs, les canaux ioniques de type récepteurs-canaux peuvent être utilisés comme "capteurs" ("channel sensors"), dans la mesure où toute modification de leur activité électrique traduit la présence d'une molécule qu'ils sont aptes à détecter. 25 Dès lors, le dispositif selon l'invention est également susceptible d'être utilisé dans le domaine de l'environnement, par exemple pour détecter des polluants, dans les industries qui effectuent des contrôles qualité sur leurs chaînes de fabrication et 30 sur les produits qui en sont issus comme les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi

que dans tous les autres secteurs où il est usuel d'effectuer des analyses toxicologiques.

#### ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

5 C'est en 1981 qu'a été mise au point par NEHER et SAKMANN la technique d'étude des canaux ioniques qui est encore la plus performante aujourd'hui, à savoir le "patch-clamp" (HAMILL et al. *Pflügers Arch.*, 1981, 391:85-100) [1]. Cette technique  
10 permet de contrôler ("clamp") les différences de potentiel électrique transmembranaire au niveau d'un fragment ("patch") de membrane plasmique ou d'une cellule entière et, partant, d'accéder directement aux flux ioniques circulants au travers des canaux ioniques  
15 de ce fragment de membrane ou de cette cellule.

En pratique, elle consiste à appliquer une micropipette en verre sur la membrane plasmique d'une cellule et à établir, par aspiration dans la micropipette, un scellement de haute résistance, de  
20 l'ordre du gigaohm (d'où le fait qu'il est usuellement désigné par le terme anglo-saxon "gigaseal"), entre l'extrémité de cette micropipette et le fragment de membrane sur lequel elle se trouve (configuration "cell-attached"), l'aspiration pouvant être poursuivie  
25 jusqu'à obtenir l'ouverture de ce fragment de membrane (configuration "whole-cell"). Le fragment de membrane peut être isolé du reste de la cellule par excision mécanique : on parle alors de configurations "inside-out" ou "outside-out".

Il est alors possible, en appliquant une tension électrique constante au fragment de membrane ou à la cellule et en enregistrant les variations de cette tension, de mesurer l'activité électrique résultant 5 d'un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques situés sur le seul fragment de membrane isolé en configuration "cell-attached" ou excisée, ou sur l'intégralité de la membrane cellulaire en configuration "whole-cell".

10 S'il est incontestable que la technique de "patch-clamp" a permis à la recherche, du fait de sa sensibilité, de faire des avancées considérables dans la connaissance des canaux ioniques, et à l'industrie pharmaceutique de disposer d'un outil de criblage de 15 molécules aptes à agir sur les canaux ioniques, il s'avère qu'elle ne donne pas totalement satisfaction.

En effet, elle présente, en premier lieu, l'inconvénient d'être très sensible aux bruits électriques et aux vibrations du milieu environnant et, 20 par conséquent, \* de nécessiter une infrastructure relativement importante (tables anti-vibrations, cages de Faraday, ...) destinée à neutraliser les effets interférents de ces bruits et vibrations.

Par ailleurs, il s'agit d'une méthode 25 entièrement manuelle, qui est assez lourde à mettre en œuvre, notamment en raison de ce que les micropipettes en verre qu'elle utilise, doivent être préparées avant chaque mesure par étirage et usinage de capillaires, et qui requiert la présence d'un expérimentateur hautement 30 qualifié, en particulier pour positionner convenablement ces micropipettes et pour obtenir le

gigaseal, sachant que l'aspiration qui permet de réaliser ce gigaseal est effectuée à la bouche.

Au surplus, le nombre d'échantillons pouvant être examinés par unité de temps est assez 5 faible et le pourcentage d'échecs important. A titre indicatif, un expérimentateur chevronné en patch-clamp est susceptible de réaliser au mieux 20 mesures par jour.

On comprend dès lors que la technique de 10 patch-clamp ne peut permettre ni la réalisation d'un criblage pharmacologique à moyen ou haut débit comme le souhaite la recherche pharmaceutique, ni celle de tests de routine comme le requiert l'utilisation des canaux ioniques en tant que capteurs.

15 Les limites de la technique de patch-clamp telle que proposée par NEHER et SAKMANN conjuguées au fait que les progrès de la génomique et des technologies de l'information ont permis de mettre en évidence à la fois une grande diversité et une grande 20 complexité des canaux ioniques, ont conduit à l'émergence, au cours de ces dernières années, de nombreuses tentatives d'amélioration de cette technique.

25 Schématiquement, deux voies ont été explorées : d'une part, celle qui vise à automatiser les mesures tout en utilisant les mêmes électrodes que dans la technique originelle (micropipettes en verre) et, d'autre part, celle qui vise à réaliser les mesures sur des puces électroniques.

Ainsi, par exemple :

- la société NEUROSEARCH a développé un appareillage de reconnaissance cellulaire automatique et de mesure sur huit cellules individualisées dans des 5 chambres séparées. Cet appareillage, qui est décrit dans WO-A-96/13721 [2], permet de réaliser des mesures d'activité électrique avec un bon rendement. Néanmoins, les cellules étant mises en culture et "patchées" sur des surfaces solides, il nécessite une sélection très 10 précise des cellules ainsi que l'utilisation d'un système de positionnement de la pipette servant à réaliser le scellement de haute résistance, propre à éviter que les électrodes d'enregistrement en verre ne se cassent.

15 - la société SOPHION BIOSCIENCES a mis au point un substrat type permettant d'enregistrer des événements électriques au sein de membranes biologiques. Ce substrat, qui est décrit dans WO-A-01/25769 [3], présente une pluralité de sites, de 20 section droite carrée et dans lesquels sont intégrées des électrodes. A l'usage, il apparaît toutefois que ces sites se prêtent mal à l'obtention d'un scellement de haute résistance avec les cellules.

- la société CENES a introduit un nouveau 25 système de patch-clamp permettant de mesurer l'activité électrique de cellules entières. Ce système, qui est décrit dans WO-A-01/71349 [4], prévoit de mettre en suspension les cellules dans un milieu liquide et de les présenter à une électrode, au niveau d'une 30 interface air/liquide dans un capillaire en verre. Ce système présente l'avantage de supprimer les problèmes

induits par les vibrations émises par le milieu environnant et ne pas nécessiter un positionnement très précis de l'électrode. Cependant, il ne permet pas de conduire des mesures en parallèle.

5 - cette même société a également proposé, dans WO-A-99/66329 [5], un substrat poreux ou perforé, arrangé en puits et de part et d'autre duquel se trouvent des électrodes. Les cellules sont positionnées sur ce substrat sous la forme d'une couche cellulaire en sorte qu'il ne permet pas d'effectuer des mesures 10 sur des cellules individualisées.

15 15 - la société CYTION a, elle, décrit dans WO-A-99/31503 [6], un dispositif de positionnement de cellules qui a la particularité de ne comprendre qu'un seul site intégré de mesure par puce et d'être dénué de structure permettant le confinement des cellules. Il en résulte un risque non négligeable d'étalement des cellules et de présence de plusieurs cellules sur un même site.

20 20 - enfin, la société AXON travaille actuellement sur un projet de dispositif qui utilise les électrodes planes en élastomère silicone proposées par YALE UNIVERSITY dans sa demande internationale WO-A-01/59447 [7]. Les premiers essais montrent que ce 25 dispositif nécessite encore de faire l'objet d'importantes améliorations.

30 Les Inventeurs se sont donc fixé pour but de fournir un dispositif qui permette de mesurer l'activité électrique d'éléments biologiques, et notamment de cellules, selon les principes du patch-clamp, afin de bénéficier des avantages de cette

technique, en particulier en termes de sensibilité, mais sans toutefois en avoir les inconvénients, de manière à ce qu'il soit possible d'effectuer avec ce dispositif des mesures simultanées d'activité électrique cellulaire à une cadence et avec une fiabilité autorisant notamment son utilisation pour le criblage à moyen et haut débit de substances potentiellement intéressantes en thérapeutique ou la réalisation de tests de routine, en particulier de diagnostic ou de toxicité.

Les Inventeurs se sont également fixé pour but de fournir un dispositif qui, tout en présentant ces avantages, ait des coûts de fabrication et d'exploitation satisfaisants.

15

#### **EXPOSE DE L'INVENTION**

Ces buts sont atteints par la présente invention qui propose un dispositif de mesure de l'activité électrique d'au moins un élément biologique, 20 lequel dispositif comprend un substrat sensiblement plan comportant une face inférieure et une face supérieure et présentant au moins une ouverture pour le logement de cet élément, et est caractérisé en ce que :

- il comprend deux plaques sensiblement planes, qui sont disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, chacune de ces plaques étant munie, sur sa face disposée en regard du substrat, d'au moins une électrode, cette électrode étant située en vis-à-vis de l'ouverture du substrat ;

- ces plaques et l'ouverture du substrat délimitent une chambre qui est remplie, en condition d'utilisation du dispositif, d'un milieu liquide ; et

5 - chacune des plaques disposées de part et d'autre du substrat comporte au moins un canal qui prend naissance à l'intérieur de ladite chambre et qui relie cette dernière à l'extérieur dudit dispositif.

Ainsi, le dispositif selon l'invention comprend, pour chaque élément biologique dont on 10 souhaite mesurer l'activité électrique :

- une chambre qui est prévue pour être remplie d'un milieu liquide au sein duquel l'élément biologique est destiné à baigner dans un logement prévu à cet effet, ledit milieu liquide servant à assurer la 15 conduction d'un courant électrique et la survie de l'élément biologique, si celui-ci est vivant ;

- une paire d'électrodes qui sont réparties sur deux plaques dont l'une forme le sommet de la chambre tandis que l'autre en forme la base, et qui 20 sont disposées en vis-à-vis du logement de l'élément biologique, ces électrodes ayant pour fonction de permettre l'application à cet élément d'une tension électrique et l'enregistrement des variations de cette tension consécutives à un changement d'état (ouverture 25 ou fermeture) de ses canaux ioniques ; et

- au moins deux canaux qui relient l'intérieur de la chambre avec l'extérieur du dispositif, et dont l'un prend naissance à la base de la chambre et est destiné à permettre la réalisation 30 d'un scellement de haute résistance entre l'élément biologique et son logement, par création d'une

dépression dans cette chambre, tandis que l'autre prend naissance au sommet de la chambre et est destiné à permettre l'introduction de substances dans cette chambre et/ou l'évacuation de ces substances hors de 5 ladite chambre.

Selon une première disposition avantageuse de l'invention, l'ouverture du substrat comprend trois parties coaxiales, à savoir une partie supérieure, une partie médiane et une partie inférieure, les parties 10 supérieure et médiane formant une cuvette pour le logement de l'élément biologique, tandis que la partie inférieure forme un espace qui est apte à loger un volume de milieu liquide suffisant pour y créer, par aspiration, une dépression propre à induire, entre 15 ladite cuvette et l'élément biologique, un scellement d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm.

De préférence, la cuvette de logement de l'élément biologique (qui sera désignée, dans ce qui suit, uniquement par le terme "cuvette" par commodité) 20 a la forme d'un entonnoir, dont la partie tronconique correspond à la partie supérieure de l'ouverture du substrat et sert de réceptacle à l'élément biologique, et dont la partie cylindrique correspond à la partie médiane de cette ouverture et sert à la réalisation du 25 scellement de haute résistance entre cet élément et ladite cuvette.

Cette forme de cuvette en entonnoir s'est, en effet, révélée être la plus apte à assurer le confinement de l'élément biologique, le respect de sa 30 forme et de son intégrité, notamment lorsqu'il s'agit d'une cellule biologique, ainsi que la déformation de

sa membrane lors de la création d'une dépression dans l'espace sous-jacent et, par voie de conséquence, à permettre l'obtention du scellement de haute résistance.

5 Conformément à l'invention, les dimensions de la partie tronconique de la cuvette servant de réceptacle à l'élément biologique, sont, de préférence, adaptées aux dimensions de cet élément, ce qui permet d'améliorer encore son confinement et l'obtention du  
10 scellement de haute résistance.

Ainsi, par exemple, lorsque l'élément biologique est une cellule de taille conventionnelle, c'est-à-dire mesurant de l'ordre de 10 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre comme c'est le cas d'un lymphocyte, la partie 15 tronconique de la cuvette - qui correspond à la partie supérieure de l'ouverture du substrat - a, de préférence, son plus grand diamètre compris entre 20 et 100  $\mu\text{m}$ , son plus petit diamètre compris entre 10 et 30  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise entre 10 et 50  $\mu\text{m}$ , tandis 20 que la partie cylindrique de cette cuvette - qui correspond à la partie médiane de l'ouverture du substrat - a, de préférence, un diamètre compris entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  et une hauteur inférieure ou égale à 100  $\mu\text{m}$ .

25 En variante, lorsque l'élément biologique est une grosse cellule, c'est-à-dire mesurant de l'ordre de 0,7 à 1 mm de diamètre comme c'est le cas d'un ovocyte, la partie tronconique de la cuvette a, de préférence, son plus grand diamètre compris entre 30 500  $\mu\text{m}$  et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise entre 300  $\mu\text{m}$  et

10 mm, tandis que la partie cylindrique de cette cuvette présente, de préférence, un diamètre compris entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  et une hauteur inférieure ou égale à 100  $\mu\text{m}$ .

5 Dans tous les cas, la partie inférieure de l'ouverture du substrat est, de préférence, cylindrique et mesure avantageusement entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre pour une hauteur de 300 à 700  $\mu\text{m}$ .

10 Selon une autre disposition avantageuse du dispositif selon l'invention, le substrat est constitué d'un ou plusieurs matériaux micro-usinables, le micro-usinage étant, en effet, une technique convenant particulièrement bien à la réalisation d'ouvertures de dimensions allant d'un dizième de micron à quelques 15 centaines de microns.

20 De préférence, le substrat est à base de silicium et est formé de deux plaques de silicium superposées qui sont solidaires d'une membrane intermédiaire, laquelle est constituée d'un matériau isolant, compatible avec les techniques de microtechnologie. Ce matériau peut être un matériau minéral tel qu'un oxyde ( $\text{SiO}_2$  par exemple) ou un 25 nitrure ( $\text{Si}_3\text{N}_4$  par exemple), ou un matériau organique (polyimide par exemple).

30 Dans ces conditions, la partie tronconique de la cuvette correspond à un évidement réalisé dans l'une des deux plaques de silicium ; sa partie cylindrique correspond à un évidement réalisé dans la membrane intermédiaire, tandis que la partie inférieure de l'ouverture du substrat correspond à un évidement réalisé dans l'autre plaque de silicium.

Bien entendu, d'autres matériaux micro-usinables peuvent parfaitement être utilisés pour la réalisation du substrat comme le verre et les matières plastiques.

5 Selon encore une autre disposition avantageuse du dispositif selon l'invention, le substrat comprend de plus, sur sa face supérieure, un film qui est constitué d'un matériau éventuellement souple, biocompatible, et qui est muni d'au moins une 10 ouverture, cette ouverture étant coaxiale avec la partie supérieure de l'ouverture sous-jacente du substrat et de même géométrie qu'elle, mais de section droite médiane supérieure à la sienne.

Cette disposition, qui est notamment utile 15 dans le cas où l'on souhaite mesurer l'activité électrique de grosses cellules, permet, non seulement d'optimiser le confinement de ce type de cellules, mais également de réduire l'épaisseur de la partie du substrat réalisée dans le matériau micro-usinable et 20 ainsi d'~~abaisser le coût de~~ fabrication de ce substrat par rapport à ce qu'il serait s'il était entièrement réalisé dans un matériau micro-usinable comme le silicium.

De manière préférée, l'ouverture du film 25 situé sur la face supérieure de la partie sous-jacente du substrat est tronconique et a son plus grand diamètre compris entre 500  $\mu\text{m}$  et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise entre 300  $\mu\text{m}$  et 1 mm.

30 Avantageusement, ce film est réalisé par moulage afin que son coût de fabrication soit

suffisamment bas pour qu'il puisse être remplacé par un film neuf à chaque nouvelle utilisation du dispositif, et est donc constitué d'un matériau apte à être moulé comme un thermoplastique du type polytétrafluoro-5 éthylène (PTFE), ou un élastomère silicone comme un polydiméthylsiloxane (PDMS).

Selon la nature du matériau qui le constitue et du matériau qui constitue la partie sous-jacente du substrat, ce film peut être maintenu sur 10 cette dernière, soit par collage, soit par un effet d'adhésion sous l'effet d'une pression.

Conformément à l'invention, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, qui peuvent être identiques ou 15 différentes, sont, de préférence, constituées d'un matériau isolant, par exemple un verre époxy, tandis que les électrodes portées par ces plaques sont, de préférence, des électrodes planes.

Ces dernières peuvent notamment être des plots d'Ag/AgCl<sup>-</sup> mais d'autres couples d'oxydo-réduction peuvent également être utilisés comme un couple Pt/PtCl<sup>-</sup>.

Dans tous les cas, les électrodes sont prévues pour être reliées, après assemblage des 25 différents éléments du dispositif, à un circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique.

Selon encore une disposition avantageuse de l'invention, la plaque disposée en regard de la face 30 supérieure du substrat comporte deux canaux, à savoir un canal pour l'introduction de substances dans la

chambre, et un canal pour l'évacuation de ces substances hors de cette chambre.

Ces canaux pour l'introduction et l'évacuation de substances traversent, de préférence, 5 la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat verticalement et sont prévus pour être respectivement reliés, de manière transitoire ou permanente, à des capillaires permettant de les relier respectivement à un système, automatique ou manuel, de 10 distribution de liquides et à un système, automatique ou manuel, d'aspiration de liquides, ces deux systèmes pouvant être connectés l'un à l'autre de manière à assurer une recirculation desdites substances dans la chambre.

15 De manière similaire, le canal que comporte la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat et qui est, lui, destiné à permettre la réalisation du scellement de haute résistance, traverse, de préférence, cette plaque verticalement, et 20 est prévu pour être relié, de manière transitoire ou permanente à un capillaire permettant de le raccorder à un système d'aspiration de liquides.

Selon une disposition préférée du dispositif selon l'invention, l'ouverture du substrat, 25 les électrodes ainsi que le canal que comporte la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat sont coaxiaux, cette disposition permettant notamment d'optimiser l'obtention du scellement de haute résistance entre la cuvette et l'élément 30 biologique, l'application à ce dernier de la tension électrique nécessaire à la mesure de son activité

électrique, l'enregistrement des variations de cette tension et, partant, la qualité des mesures ainsi effectuées.

Selon une autre disposition préférée du 5 dispositif selon l'invention, celui-ci comprend des moyens pour étancher la chambre, lesquels servent également à amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant, et qui seront désignés, dans ce qui suit, uniquement par 10 l'expression "moyens d'étanchéité" par commodité.

Ces moyens d'étanchéité consistent, de préférence, en un premier joint, qui est intercalé entre le substrat et la plaque disposée en regard de la face inférieure de ce substrat et en un deuxième joint, 15 identique ou non au précédent, qui est intercalé entre le substrat et la plaque disposée en regard de la face supérieure de ce substrat, chacun de ces joints étant muni d'au moins une perforation disposée et dimensionnée de manière à circonscrire l'électrode 20 située sur la plaque au contact de laquelle il se trouve.

Avantageusement, ces joints sont constitués d'un matériau qui, outre d'être étanche aux liquides, est souple, légèrement compressible et est apte à être 25 moulé de manière à ce qu'ils puissent être réalisés par moulage, ce qui permet, d'une part, de les adapter parfaitement à la configuration du substrat et, d'autre part, de les fabriquer à un coût suffisamment faible pour qu'il soit possible de les remplacer par des 30 joints neufs à chaque nouvelle utilisation du dispositif. Un tel matériau est, par exemple, un

élastomère comme un élastomère silicone tel qu'un polydiméthylsiloxane.

Selon encore une autre disposition préférée, le substrat, les plaques disposées de part et 5 d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les moyens d'étanchéité lorsque ces derniers sont présents sont des modules qui sont assemblés de manière amovible.

Dans ce cas, le dispositif selon 10 l'invention comprend avantageusement des moyens pour maintenir ces modules en condition d'assemblage.

Ces moyens de maintien peuvent être des moyens solidaires des plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, 15 et qui coopèrent pour fixer de manière amovible ces plaques l'une à l'autre, comme des charnières, des glissières ou des moyens de vissage. Ils peuvent également être des moyens indépendants de ces plaques et qui s'emboîtent sur les bords de l'empilement 20 constitué par les différents modules.

L'assemblage des modules, et plus particulièrement l'alignement des axes des ouvertures du substrat, des électrodes portées par les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et 25 supérieure de ce substrat, et des perforations des moyens d'étanchéité, peuvent être facilités par la présence, notamment sur lesdites plaques, de moyens de guidage mécaniques (ergots d'alignement, rainures en coin, ...), optiques (fibres optiques passant dans des 30 trous préformés) ou autres.

Conformément à l'invention, on préfère que le dispositif permette de mesurer en parallèle l'activité électrique de plusieurs éléments biologiques, auquel cas :

5 - le substrat présente une pluralité d'ouvertures identiques et régulièrement espacées les unes des autres ;

10 - les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat sont des circuits imprimés qui sont munis chacun d'autant d'électrodes que le substrat comporte d'ouvertures ;

15 - la plaque disposée en regard de la face inférieure du substrat comporte au moins autant de canaux que le substrat comporte d'ouvertures ;

20 - la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat comporte au moins autant de canaux pour l'introduction de substances et au moins autant de canaux pour l'évacuation de substances que le substrat comporte d'ouvertures ;

25 ledit substrat et ses ouvertures, lesdites plaques, lesdites électrodes et lesdits canaux étant tels que précédemment définis.

Selon un mode de réalisation préféré de ce dispositif, celui-ci comprend de plus deux joints identiques, munis chacun d'autant de perforations que le substrat comporte d'ouvertures, ces joints et ces perforations étant tels que précédemment définis.

Par ailleurs, selon ce mode de réalisation préféré, le dispositif comprend encore deux pinces identiques, qui s'emboîtent sur les bords de l'empilement constitué par le substrat, les plaques

disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les joints.

Dans ces conditions, le dispositif selon l'invention, bien que comprenant sept éléments, se 5 compose de cinq modules différents qui peuvent être assemblés et désassemblés à volonté, le substrat correspondant à un premier module, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat correspondant respectivement à 10 un deuxième et à un troisième module, les joints correspondant à deux exemplaires d'un quatrième module, tandis que les pinces correspondent à deux exemplaires d'un cinquième module.

Le dispositif selon l'invention présente de 15 nombreux avantages.

En effet, tout en permettant d'effectuer des mesures d'activité électrique cellulaire selon les principes du patch-clamp, il simplifie considérablement la mise en œuvre de cette technique :

20 - d'une part, en supprimant les opérations de préparation des micropipettes en verre et de manipulation de ces micropipettes, l'opération d'aspiration à la bouche nécessaire à l'obtention du gigaseal, la nécessité d'utiliser un microscope ainsi 25 que des appareillages propres à éviter, ou à tout le moins, limiter les interférences avec les bruits électriques et les vibrations émis dans le milieu environnant ; et

30 - d'autre part, en offrant la possibilité d'automatiser en tout ou partie ces mesures d'activité électrique, et notamment la réalisation du scellement

de haute résistance, la distribution de substances dans des chambres indépendantes les unes des autres, l'application de la tension électrique et l'enregistrement des variations de cette tension, en 5 plaçant les systèmes d'aspiration et de distribution de substances ainsi que le circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique sous le contrôle d'un système informatique.

Il en résulte que le dispositif selon 10 l'invention rend la technique du patch-clamp accessible à des laboratoires et des utilisateurs n'ayant aucune expérience dans ce domaine. Il en résulte également qu'il permet de réaliser des mesures d'activité électrique cellulaire avec un rendement très 15 satisfaisant tout en garantissant la fiabilité, et notamment la reproductibilité, de ces mesures.

Par ailleurs, il offre une grande souplesse d'utilisation, dans la mesure où il permet d'effectuer des mesures d'activité électrique aussi bien sur une 20 pluralité de cellules traitées simultanément que sur une seule cellule, en configuration "cell-attached" comme en configuration "whole-cell", et, dans le cas où les mesures sont conduites en parallèle sur plusieurs cellules, en utilisant des paramètres qui peuvent être 25 différents d'une cellule à l'autre. Ainsi, par exemple, le milieu de survie, la substance à tester ou à détecter, la concentration de cette substance, la tension électrique peuvent être différents d'une cellule à l'autre.

30 Il peut, de plus, accueillir, outre des cellules entières, soit des organelles de cellules

biologiques, soit des fragments de membranes biologiques agrémentés ou non de parties cytosoliques, soit des bicouches lipidiques artificielles, soit encore des membranes biomimétiques.

5           Cette souplesse d'utilisation est encore accrue lorsque le dispositif selon l'invention est un système modulaire puisque, dans ce cas, les différents modules peuvent être remplacés ou, au contraire, réutilisés d'une mesure à l'autre ou d'une série de  
10 mesures à l'autre.

Enfin, il est susceptible d'être fabriqué à des coûts extrêmement intéressants, notamment lorsqu'il se présente sous la forme d'un système modulaire puisque, dans ce cas, sa fabrication ne comporte pas  
15 d'opération d'assemblage, ni d'opération de contrôle de la qualité de cet assemblage. De manière similaire, les coûts d'exploitation d'un tel dispositif peuvent être très avantageux, dans la mesure où il est possible de remplacer certains des modules qui le constituent, soit  
20 parce qu'ils sont prévus pour être à usage unique, soit parce qu'ils se sont altérés, tout en conservant les autres.

Compte tenu de ce qui précède, le dispositif selon l'invention est susceptible de  
25 constituer un outil de choix pour le criblage de molécules à visée thérapeutique, le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques, et pour la détection de substances toxiques, que ce soit dans le domaine de l'environnement ou dans  
30 les industries agroalimentaire, pharmaceutique ou cosmétique.

Outre les dispositions qui précédent,  
l'invention comprend encore d'autres dispositions qui  
ressortiront du complément de description qui suit, qui  
se rapporte à des exemples de réalisation d'un  
5 dispositif selon l'invention et qui est donné à titre  
illustratif et non limitatif, en référence aux dessins  
annexés.

#### BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

10 La figure 1 est une représentation  
schématique d'un dispositif selon l'invention, vu en  
perspective éclatée, dans une forme de réalisation  
conçue pour la mesure en parallèle de l'activité  
électrique de neuf cellules biologiques.

15 La figure 2 est une représentation  
schématique du dispositif de la figure 1, vu en coupe  
suivant le plan P de cette figure 1.

20 Les figures 3 à 5 sont des représentations  
schématiques d'une portion d'un dispositif selon  
l'invention, dans une vue analogue à celle de la figure  
2, mais pour trois variantes de réalisation de ce  
dispositif.

25 La figure 6 est une représentation  
schématique d'une portion, vue en coupe, du substrat  
entrant dans la constitution d'un dispositif selon  
l'invention, dans une variante de réalisation adaptée à  
la mesure de l'activité électrique de grosses cellules.

## EXPOSE DETAILLE D'EXEMPLES DE REALISATION

On se réfère tout d'abord aux figures 1 et 2 qui représentent de façon schématique un dispositif 10 selon l'invention, dans une forme de réalisation 5 conçue pour permettre une mesure en parallèle de l'activité électrique de neuf cellules biologiques.

La figure 1 étant une vue en perspective éclatée, elle montre les différents éléments constitutifs du dispositif 10 avant leur assemblage, 10 tandis que la figure 2, qui correspond à une coupe suivant le plan P de la figure 1, montre ces mêmes éléments une fois assemblés les uns aux autres.

Comme visible sur les figures 1 et 2, le dispositif 10, qui est de forme générale carrée, se 15 compose de sept éléments aptes à être assemblés les uns aux autres de manière amovible, à savoir :

- un premier circuit imprimé 11, qui forme le fond de ce dispositif ;
- un substrat 12, sensiblement plan, qui 20 est disposé au-dessus du circuit imprimé 11 et qui a pour fonction d'assurer un confinement des cellules 18 grâce à des ouvertures 120 qu'il comporte ;
- un deuxième circuit imprimé 13, qui est lui-même disposé au-dessus du substrat 12 et qui forme 25 le couvercle du dispositif 10 ; ce circuit imprimé délimite, conjointement avec le circuit imprimé 11 et les ouvertures 120 du substrat 12 des chambres 19 au centre desquelles les cellules dont on veut mesurer l'activité électrique vont être placées, à raison d'une 30 cellule par chambre, et qui sont donc destinées à être

remplies d'un milieu extracellulaire ou faisant fonction de milieu extracellulaire ;

- deux joints perforés 14 et 15, qui sont intercalés entre le circuit imprimé 11 et le substrat 12 pour le premier, et entre ce substrat et le circuit imprimé 13 pour le deuxième, et qui servent à assurer l'étanchéité du dispositif, notamment entre les chambres 19, ainsi qu'à amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant ; et
- 10 - deux pinces 16 et 17, qui ont pour fonction de maintenir les éléments précédents en condition d'assemblage.

Ces sept éléments correspondent à 5 modules différents : ainsi, le circuit imprimé 11 correspond à un premier module ou module A ; le substrat 12 correspond à un deuxième module ou module B ; le circuit imprimé 13 correspond à un troisième module ou module C ; les joints 14 et 15 correspondent à deux exemplaires d'un quatrième module ou module D, tandis que les pinces 16 et 17 correspondent à deux exemplaires d'un cinquième module ou module E.

Comme montré par les figures 1 et 2, le substrat 12 ou module B, qui représente l'élément médian du dispositif 10, comprend neuf ouvertures 120 réparties sur trois lignes et trois colonnes.

Ces ouvertures ont une double fonction, à savoir, d'une part, former des microcuvettes aptes à permettre le confinement des cellules dont on veut mesurer l'activité électrique et, d'autre part, autoriser la réalisation, entre ces cuvettes et ces cellules, d'un "gigaseal", c'est-à-dire d'un scellement

d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm, sous l'effet de la création d'une dépression au sein de la partie des chambres 19 située au-dessous de ces cuvettes.

5 De ce fait, comme visible sur la figure 2, le substrat 12 est formé de deux plaques superposées, respectivement 121 et 123, qui sont réunies par une membrane intermédiaire 122 dont elles sont solidaires, ces plaques et cette membrane étant évidées de telle 10 sorte que :

15 - d'une part, les cuvettes destinées au confinement des cellules 18 ont la forme d'entonnoirs, dont les parties tronconiques correspondent à des évidements tronconiques réalisés dans la plaque 121, et dont les parties cylindriques correspondent à des évidements cylindriques réalisés dans la membrane intermédiaire 122 ; et

20 - d'autre part, les cuvettes communiquent avec des espaces cylindriques 125 sous-jacents, de même axe qu'elles et qui correspondent à des évidements cylindriques réalisés dans la plaque 123 et qui sont aptes à loger un volume de milieu liquide suffisant pour y créer, par aspiration, la dépression nécessaire à l'obtention du gigaseal.

25 Comme visible sur la figure 2, qui représente, sous une forme très schématique, une cellule avant obtention du gigaseal (cellule de gauche) et une cellule après obtention du gigaseal (cellule de droite), la partie tronconique des cuvettes sert de 30 réceptacle aux cellules 18, tandis que leur partie cylindrique sert à la réalisation du gigaseal, ce

dernier étant, en effet, obtenu par déformation de la membrane plasmique desdites cellules et adhésion de cette membrane par invagination contre la paroi de ladite partie cylindrique.

5 A titre d'exemple, des cuvettes :

- dont la partie tronconique mesure 50  $\mu\text{m}$  au niveau de son plus grand diamètre, 30  $\mu\text{m}$  au niveau de son plus petit diamètre et 10  $\mu\text{m}$  de hauteur,

10 - dont la partie cylindrique mesure 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'un moins d'un micron de hauteur, et  
- qui surmontent un espace cylindrique présentant un diamètre de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre pour une hauteur de 450  $\mu\text{m}$ ,

15 se sont révélées particulièrement bien convenir à des cellules de taille conventionnelles.

On comprend dès lors que les plaques 121 et 123 du substrat 12 sont, de préférence, réalisées dans un matériau aisément micro-usinable, en particulier du silicium, la membrane intermédiaire 122 étant alors préférentiellement constituée d'un matériau à forte constante diélectrique, propre à être micro-usiné de manière collective (microtechnologie) et à être assemblé par collage à une plaque de silicium. Un tel matériau est, par exemple, du dioxyde de silicium 25 ( $\text{SiO}_2$ ) ou du nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) lorsque les plaques 121 et 123 sont réalisées en silicium.

Le circuit imprimé 11 ou module A sert, conjointement avec le circuit imprimé 13 ou module C, à appliquer aux cellules 18 une tension électrique, via 30 le milieu liquide dans lequel elles baignent. Le circuit imprimé 11 sert, de plus, à enregistrer les

variations de cette tension induites par un changement d'état (ouverture ou fermeture) des canaux ioniques desdites cellules.

De ce fait, les circuits imprimés 11 et 13, 5 dont les supports isolants peuvent être réalisés dans un matériau conventionnel du type verre époxy, portent chacun, sur leur face en regard du substrat 12, neuf plots d'électrodes, respectivement 110 et 130, qui sont disposés de façon à ce que l'axe de chacun d'eux se 10 confonde avec l'axe de la partie cylindrique d'une cuvette, et qui sont prévus pour être reliés à un circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique (non représenté sur les figures 1 et 2).

15 Ainsi, par exemple, les plots d'électrodes 130 du circuit imprimé 13 peuvent être reliés à une source à potentiel constant, par exemple la terre, tandis que les plots d'électrodes 110 du circuit imprimé 11 peuvent être connectés à la fois à un 20 générateur électrique, via un amplificateur, et à un circuit d'adressage propre à permettre le recueil séquentiel des variations de tension électrique enregistrées par ces plots. Ce circuit d'adressage peut être lui-même relié, également via un amplificateur, à 25 un appareil capable de mesurer la variation d'une grandeur électrique comme un voltmètre ou un ampèremètre, et qui est raccordé à la même source de potentiel constant que celle à laquelle les plots d'électrodes 130 du circuit imprimé 13 sont connectés.

30 Le fonctionnement du circuit d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique,

ainsi que l'analyse des données recueillies sont, de préférence, gérés par un système informatique analogue à ceux déjà utilisés dans le domaine du patch-clamp.

Par ailleurs, le circuit imprimé 11 est traversé par neuf canaux 111 de microfluidique, de quelques centaines de microns de diamètre, et dont la fonction est de permettre la création par aspiration, dans les espaces cylindriques 125, de la dépression nécessaire à l'obtention du gigaseal. De ce fait, ces canaux 111 traversent les plots d'électrodes 110 et sont prévus pour être reliés, au niveau de la face externe du circuit imprimé 11, à des capillaires (non représentés sur les figures 1 et 2), lesquels sont eux-mêmes connectés à un ou plusieurs systèmes d'aspiration tels que classiquement utilisés pour aspirer un liquide (trompes à eau par exemple).

Le circuit imprimé 13 est également traversé par des canaux de microfluidique, de quelques centaines de microns de diamètre, mais ceux-ci sont au nombre de dix-huit et se répartissent en neuf canaux 131 dont la fonction est de permettre l'introduction de substances dans les chambres 19, et neuf canaux 132 dont la fonction est de permettre l'évacuation de ces substances hors desdites chambres. Les canaux 131 et 132 peuvent également être utilisés pour assurer une recirculation desdites substances à l'intérieur des chambres 19.

Dans la forme de réalisation du dispositif selon l'invention montrée sur la figure 1, les canaux 131 et 132 sont disposés de part et d'autre des plots d'électrodes 130. Comme les canaux 111, ils sont prévus

pour être reliés à des capillaires (non représentés sur les figures 1 et 2), qui sont eux-mêmes connectés à un ou plusieurs systèmes de distribution de liquides (microseringues, micropompes, ...) et à un ou plusieurs systèmes d'aspiration de liquides ou encore à un ou plusieurs systèmes propres à assurer une recirculation des substances dans les chambres 19.

Là également, le fonctionnement de ces différents systèmes de distribution, d'aspiration ou de recirculation est, de préférence, géré par un système informatique.

Comme précédemment mentionné, deux joints 14 et 15, qui correspondent à deux modules D, sont intercalés entre le circuit imprimé 11 et le substrat 12 pour le premier, et entre ce substrat et le circuit imprimé 13 pour le deuxième, en vue d'assurer l'étanchéité du dispositif, notamment entre les chambres 19, et d'amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant.

Pour ce faire, ces joints sont munis de perforations circulaires, respectivement 140 et 150, qui présentent un diamètre légèrement supérieur à la fois au diamètre le plus large des cuvettes et au diamètre des espaces cylindriques 125 et dont l'axe se confond avec l'axe de ces cuvettes et de ces espaces cylindriques.

Par ailleurs, ces joints, qui peuvent ne faire que quelques microns d'épaisseur, sont constitués d'un matériau éventuellement souple, légèrement compressible et étanche aux liquides, lequel est, de

préférence, un élastomère comme un élastomère silicone tel qu'un polydiméthylsiloxane (PDMS).

Par ailleurs, ils sont, de préférence, fabriqués par moulage de manière à ce que, d'une part, 5 ils soient parfaitement adaptés à la configuration du substrat 12, et, d'autre part, leur coût de fabrication soit suffisamment faible pour qu'ils puissent être remplacés par des joints neufs à chaque nouvelle utilisation du dispositif 10.

10 Les pinces, qui correspondent à deux modules E, ont pour fonction de maintenir les modules A, B, C et D, une fois ceux-ci assemblés les uns aux autres. De section droite en U et de longueur sensiblement égale aux bords des circuits imprimés 11 15 et 13, elles sont aptes à s'emboîter sur les bords de l'empilement constitué par lesdits modules après application d'une légère pression sur cet empilement.

On se réfère à présent aux figures 3 à 5 qui montrent une portion d'un dispositif 10, dans trois 20 variantes de réalisation qui se distinguent entre elles et de la forme de réalisation représentée sur les figures 1 et 2, par la disposition des canaux 131 et 132 de microfluidique.

Dans la variante de réalisation montrée sur 25 la figure 3, les canaux 131 et 132 traversent tous deux le plot d'électrode 130.

Dans la variante de réalisation montrée sur la figure 4, un seul de ces canaux, par exemple le canal 131 traverse le plot d'électrode 130, le canal 30 132 étant, lui, disposé latéralement à ce plot d'électrode, tandis que, dans la variante de

réalisation montrée sur la figure 5, les deux canaux 131 et 132 sont disposés latéralement et du même côté dudit plot d'électrode.

La figure 6 montre, elle, une portion d'un substrat 12 destiné à entrer dans la constitution d'un dispositif 10, dans une variante de réalisation conçue pour mesurer l'activité électrique de grosses cellules, c'est-à-dire de cellules mesurant de l'ordre de 0,7 à 1 mm de diamètre.

Dans cette variante de réalisation, le substrat 12 comprend, sur la plaque 121, un film 126 qui est constitué d'un matériau éventuellement souple, biocompatible tel qu'un PDMS, une résine ou un thermoplastique, et qui est muni d'ouvertures 127. Ces dernières sont dimensionnées de telle sorte que les cuvettes comprennent dans ce cas deux parties tronconiques superposées : une première partie, qui correspond aux évidements réalisés dans la plaque 121, et une seconde partie, qui correspond aux ouvertures 127 du film 126.

A titre d'exemple, des cuvettes :

- dont la première partie tronconique mesure 500  $\mu\text{m}$  au niveau de son plus grand diamètre, 300  $\mu\text{m}$  au niveau de son plus petit diamètre et une hauteur de 450  $\mu\text{m}$ ,

- dont la seconde partie tronconique mesure 1 mm au niveau de son grand diamètre, 600  $\mu\text{m}$  au niveau de son plus petit diamètre et 1 mm de hauteur, et

- dont la partie cylindrique mesure 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et moins d'un micron de hauteur, ont donné d'excellents résultats.

Là également, on préfère que le film 126 soit réalisé par moulage de manière à ce que son coût de fabrication soit suffisamment bas pour qu'il puisse, comme les joints 14 et 15, être remplacé par un film 5 neuf à chaque nouvelle utilisation du dispositif 10.

Dans le cas où il est destiné à servir à la mesure de l'activité électrique de cellules de taille conventionnelle, le substrat 12 peut être réalisé à base de silicium, par exemple par un procédé comprenant 10 les étapes suivantes :

a) la préparation de la plaque 123 par :

- polissage, sur ses deux faces, d'une première plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur d'environ 450  $\mu\text{m}$  ;

15 - dépôt, sur les deux faces de la plaque de silicium ainsi polie, d'une couche de  $\text{SiO}_2$  ;

- réalisation, dans l'épaisseur de l'une des deux couches de  $\text{SiO}_2$ , d'ouvertures cylindriques d'environ 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre ; et

20 - réalisation, dans l'épaisseur de l'autre couche de  $\text{SiO}_2$  et de la plaque de silicium, d'évidements cylindriques de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre par gravure chimique profonde, en veillant à ce que l'axe de ces évidements se confonde avec celui des ouvertures 25 réalisées à l'étape précédente ;

b) la solidarisation, par collage moléculaire, de la plaque 123 ainsi obtenue avec une seconde plaque de silicium préalablement polie sur ses deux faces, cette dernière étant destinée à former la future plaque 30 121 ;

c) le polissage de cette deuxième plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  ;

d) le dépôt, sur cette deuxième plaque de silicium, d'une couche de  $\text{SiO}_2$  ou de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , et

5 e) la réalisation, dans l'épaisseur de la couche de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  et de la deuxième plaque de silicium, d'évidements tronconiques.

Dans le cas où il est destiné à servir à la mesure de l'activité électrique de grosses cellules, le 10 substrat 12 peut être réalisée à base de silicium, par exemple par un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la préparation de la plaque 123 comme précédemment décrit ;

15 b) la préparation de la plaque 121 par :

- polissage, sur ses deux faces, d'une deuxième plaque de silicium jusqu'à obtention d'une épaisseur d'environ 450  $\mu\text{m}$  ;

- dépôt, sur les deux faces de la plaque 20 de silicium ainsi polie, d'une couche de  $\text{SiO}_2$  ou de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ;

- réalisation, dans l'épaisseur de l'une des deux couches de  $\text{SiO}_2$  ou de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , d'ouvertures cylindriques d'environ 500  $\mu\text{m}$  de diamètre ;

25 - réalisation à partir de ces ouvertures, d'évidements tronconiques dans l'épaisseur de la plaque de silicium par gravure chimique profonde ;

c) la solidarisation, par collage moléculaire, de la plaque 121 ainsi obtenue avec la plaque 123, puis 30 éventuellement ;

d) le collage ou l'adhésion par simple pression d'un film 126 sur la plaque 121.

L'utilisation du dispositif 10 est extrêmement simple.

5 En effet, après avoir déposé un module D sur un module A, puis un module B adapté à la taille des cellules dont on veut mesurer l'activité électrique, sur le module D, on remplit les cuvettes du module B d'un milieu extracellulaire ou apte à servir 10 de milieu extracellulaire, ce milieu devant être capable d'assurer à la fois la conduction d'un courant électrique et la survie des cellules.

15 On aspire l'air présent dans les espaces cylindriques 125 à l'aide des canaux 111 de microfluidique, pour permettre au milieu extracellulaire de s'écouler dans ces espaces. On renouvelle cette opération jusqu'au remplissage complet des espaces cylindriques 125, puis des cuvettes par l'édit milieu extracellulaire.

20 On dépose les cellules dans ces dernières, à raison d'une cellule par cuvette, et on aspire de nouveau, par les canaux 111 de microfluidique, dans les espaces cylindriques 125 pour obtenir un scellement de haute résistance entre chacune des cellules avec la 25 cuvette dans laquelle elle se trouve, puis éventuellement la rupture du fragment de membrane plasmique ainsi scellé si l'on souhaite travailler en configuration "whole-cell".

30 Une fois ce scellement obtenu pour toutes les cellules, on recouvre le module B d'un module D, puis le module D par un module C et, après application

d'une légère pression sur l'empilement des modules A, B, C et D résultant, on procède à la fixation des modules E.

On connecte le dispositif 10 au circuit 5 d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique et on procède aux mesures de l'activité électrique des cellules exactement comme dans la technique de patch-clamp originelle, à ceci près que les substances à tester ou à détecter sont introduites 10 dans les chambres 19 par l'intermédiaire des canaux 131 de microfluidique.

Lorsque les tests sont terminés, le dispositif 10 peut être aisément démonté en vue d'une nouvelle utilisation. En effet, il suffit, après 15 déconnexion du système d'alimentation électrique et de mesure d'une grandeur électrique, de retirer les modules E, pour être en mesure de séparer les modules A, B, C et D les uns des autres. Les modules A, B et C peuvent être réutilisés après un lavage approprié, 20 tandis que les modules D sont jetés pour être remplacés par des modules neufs lors d'une utilisation ultérieure dudit dispositif.

L'invention ne se limite nullement au mode de réalisation qui vient d'être décrit. Ainsi, par 25 exemple, le dispositif selon l'invention est susceptible d'être adapté à la mesure en parallèle de d'activité électrique d'un nombre beaucoup plus important de cellules, par exemple de 1000 cellules, voire plus, auquel cas le substrat 12 est conçu pour 30 recevoir ce nombre de cellules.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

5 [1] HAMILL et al. *Pflügers Arch.*, 1981, **391**:85-100

10 [2] WO-A-96/13721

[3] WO-A-01/25769

[4] WO-A-01/71349

[5] WO-A-99/66329

[6] WO-A-99/31503

[7] WO-A-01/59447

## REVENDICATIONS

1. Dispositif (10) de mesure de l'activité électrique d'au moins un élément biologique, comprenant 5 un substrat (12) sensiblement plan, qui comporte une face inférieure et une face supérieure et qui présente au moins une ouverture (120) pour le logement de cet élément (18), caractérisé en ce que :

10 - il comprend deux plaques (11, 13) sensiblement planes, qui sont disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat, chacune de ces plaques étant munie, sur sa face disposée en regard du substrat, d'au moins une électrode (110, 130), cette électrode étant située en 15 vis-à-vis de l'ouverture (120) du substrat (12) ;

- ces plaques et l'ouverture (120) du substrat (12) délimitent une chambre (19) qui est remplie, en condition d'utilisation du dispositif, d'un milieu liquide ; et

20 ~~et~~ chacune des plaques (11, 13) disposée de part et d'autre du substrat (12) comporte au moins un canal qui prend naissance à l'intérieur de ladite chambre et qui relie cette dernière à l'extérieur du dispositif.

25

2. Dispositif (10) selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'ouverture (120) du substrat (12) comprend une partie supérieure, une partie médiane et une partie inférieure coaxiales, les parties 30 supérieure et médiane formant une cuvette pour le logement de l'élément biologique (18), tandis que la

partie inférieure forme un espace (125) apte à loger un volume de milieu liquide suffisant pour qu'il soit possible d'y créer, par aspiration, une dépression propre à induire un scellement entre ledit élément et 5 ladite cuvette d'une résistance au moins égale à 1 gigaohm.

3. Dispositif (10) selon la revendication 2, caractérisé en ce que la partie supérieure de 10 l'ouverture (120) du substrat (12) est de forme tronconique, tandis que la partie médiane de cette ouverture est de forme cylindrique.

4. Dispositif (10) selon la revendication 15 3, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) a son plus grand diamètre compris entre 20 et 100  $\mu\text{m}$ , son plus petit diamètre compris entre 10 et 30  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise de 10 à 50  $\mu\text{m}$ , tandis que la partie médiane de 20 cette ouverture a un diamètre compris entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  et une hauteur inférieure ou égale à 100  $\mu\text{m}$ .

5. Dispositif (10) selon la revendication 25 3, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) a son plus grand diamètre compris entre 500  $\mu\text{m}$  et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise entre 300  $\mu\text{m}$  et 10 mm, tandis que la partie médiane de cette ouverture présente un diamètre compris

entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  et une hauteur inférieure ou égale à 100  $\mu\text{m}$ .

6. Dispositif (10) selon l'une quelconque 5 des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la partie inférieure de l'ouverture (120) du substrat (12) est cylindrique et mesure entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  de diamètre pour une hauteur de 300 à 700  $\mu\text{m}$ .

10 7. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (12) est constitué d'un ou plusieurs matériaux micro-usinables.

15 8. Dispositif (10) selon la revendication 7, caractérisé en ce que le substrat (12) est à base de silicium.

9. Dispositif selon l'une quelconque des 20 revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (12) est formé de deux plaques (121, 123) de silicium superposées, qui sont solidaires d'une membrane (122) intermédiaire constituée d'un matériau isolant.

25 10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que la partie supérieure de l'ouverture (120) du substrat (12) est ménagée dans l'une des plaques de silicium, la partie médiane de 30 cette ouverture est ménagée dans la membrane intermédiaire, tandis que la partie inférieure de

ladite ouverture est ménagée dans l'autre des plaques de silicium.

11. Dispositif (10) selon l'une quelconque  
5 des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que le substrat (12) comprend de plus, sur sa face supérieure, un film (126) qui est constitué d'un matériau biocompatible et qui est muni d'au moins une ouverture (127), cette ouverture étant coaxiale avec la partie 10 supérieure de l'ouverture sous-jacente du substrat, de même géométrie qu'elle et de section supérieure à la sienne.

12. Dispositif (10) selon la revendication  
15 11, caractérisé en ce que l'ouverture du film (126) est tronconique et a son plus grand diamètre compris entre 500  $\mu\text{m}$  et 1,5 mm, son plus petit diamètre compris entre 200 et 600  $\mu\text{m}$  et une hauteur comprise entre 300  $\mu\text{m}$  et 1 mm.

20

13. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure du substrat sont 25 constituées d'un matériau isolant, et en ce que les électrodes (110, 130) portées par ces plaques sont des électrodes planes, notamment des plots d' $\text{Ag}/\text{AgCl}^-$ .

14. Dispositif (10) selon l'une quelconque  
30 des revendications précédentes, caractérisé en ce que la plaque (13) disposée en regard de la face supérieure

du substrat (12) comporte deux canaux (131, 133) dont l'un sert à l'introduction de substances dans la chambre (19), tandis que l'autre sert à l'évacuation de ces substances hors de cette chambre.

5

15. Dispositif (10) selon la revendication 14, caractérisé en ce que les canaux (131, 133) que comporte la plaque disposée en regard de la face supérieure du substrat (12) traverse verticalement 10 cette plaque.

16. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le canal (111) que comporte la plaque (11) disposée en 15 regard de la face inférieure du substrat (12) traverse verticalement cette plaque.

17. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que 20 l'ouverture (120) du substrat (12), les électrodes (110, 130) portées par les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et le canal (111) que comporte la plaque (11) disposée en regard de la face inférieure du 25 substrat sont coaxiaux.

18. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (14, 15) pour étancher la chambre 30 (19) et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant.

19. Dispositif (10) selon la revendication  
16, caractérisé en ce que les moyens pour étancher la  
chambre et amortir les bruits électriques et les  
5 vibrations provenant du milieu environnant consistent  
en un premier joint (14), qui est intercalé entre le  
substrat (12) et la plaque (11) disposée en regard de  
la face inférieure de ce substrat, et en un deuxième  
joint (15), qui est intercalé entre le substrat (12) et  
10 la plaque (13) disposée en regard de la face inférieure  
de ce substrat, chacun de ces joints étant muni d'au  
moins une perforation (140, 150) qui est disposée et  
dimensionnée de manière à circonscrire l'électrode  
située sur la plaque au contact de laquelle il se  
15 trouve.

20. Dispositif (10) selon l'une quelconque  
des revendications précédentes, caractérisé en ce que  
le substrat (12), les plaques (11, 13) disposées de  
20 part et d'autre des faces inférieure et supérieure de  
ce substrat (12), et les moyens (14,15) pour étancher  
la chambre et amortir les bruits électriques et les  
vibrations provenant du milieu environnant, lorsque ces  
derniers sont présents, sont des modules qui sont  
25 assemblés de manière amovible.

21. Dispositif (10) selon la revendication  
20, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (16,  
17) pour maintenir, en condition d'assemblage, le  
30 substrat (12), les plaques (11, 13) qui sont disposées  
de part et d'autre des faces inférieure et supérieure

de ce substrat et les moyens (14, 15) pour étancher la chambre et amortir les bruits électriques et les vibrations provenant du milieu environnant, lorsque ces derniers sont présents.

5

22. Dispositif (10) selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, ce dispositif étant prévu pour mesurer en parallèle l'activité électrique de plusieurs éléments 10 biologiques :

- le substrat (12) présente une pluralité d'ouvertures (120) identiques et régulièrement espacées les unes des autres ;

15 - les plaques (11, 13) disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat sont des circuits imprimés qui sont munis chacun d'autant d'électrodes (110, 130) que le substrat (12) comporte d'ouvertures ;

20 - la plaque (11) disposée en regard de la face inférieure du substrat comporte au moins autant de canaux (111) que le substrat (12) comporte d'ouvertures ;

25 - la plaque (13) disposée en regard de la face supérieure du substrat comporte au moins autant de canaux (131) pour l'introduction de substances et au moins autant de canaux (132) pour l'évacuation de substances que le substrat comporte d'ouvertures ;

30 ledit substrat et ses ouvertures, lesdites plaques, lesdites électrodes et lesdits canaux étant tels que précédemment définis.

23. Dispositif (10) selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend deux joints identiques, munis chacun d'autant de perforations que le substrat comporte d'ouvertures, ces joints et ces 5 perforations étant tels que précédemment définis.

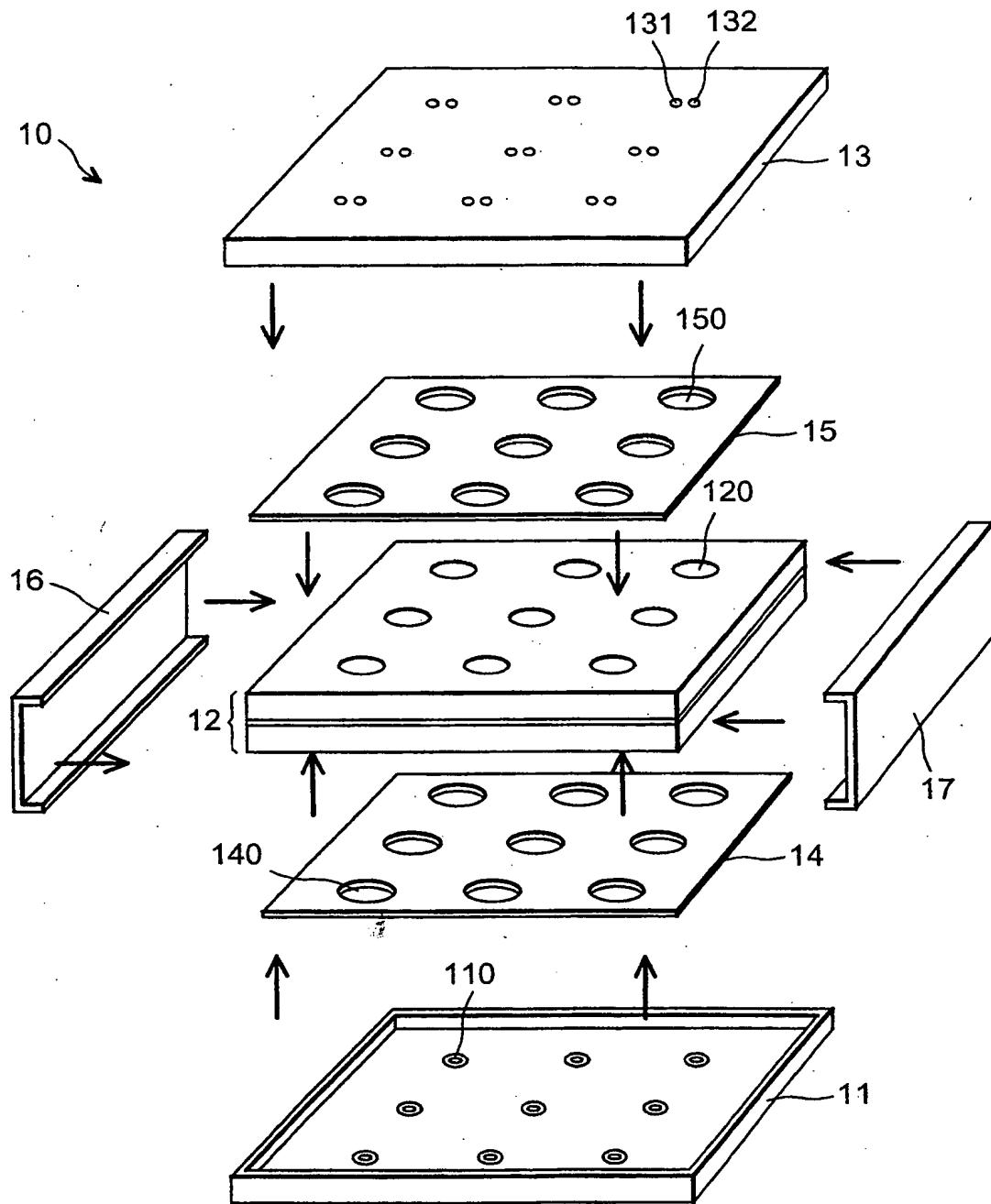
24. Dispositif (10) selon la revendication 22 ou la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend deux pinces identiques qui s'emboîtent sur les 10 bords de l'empilement constitué par le substrat, les plaques disposées de part et d'autre des faces inférieure et supérieure de ce substrat et les joints.

25. Application d'un dispositif (10) tel 15 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour le criblage de molécules à visée thérapeutique.

26. Application d'un dispositif (10) tel 20 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour le diagnostic de pathologies liées à un dysfonctionnement des canaux ioniques.

27. Application d'un dispositif (10) tel 25 que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 24, pour la détection de substances toxiques.

1 / 4



**FIG. 1**

2 / 4

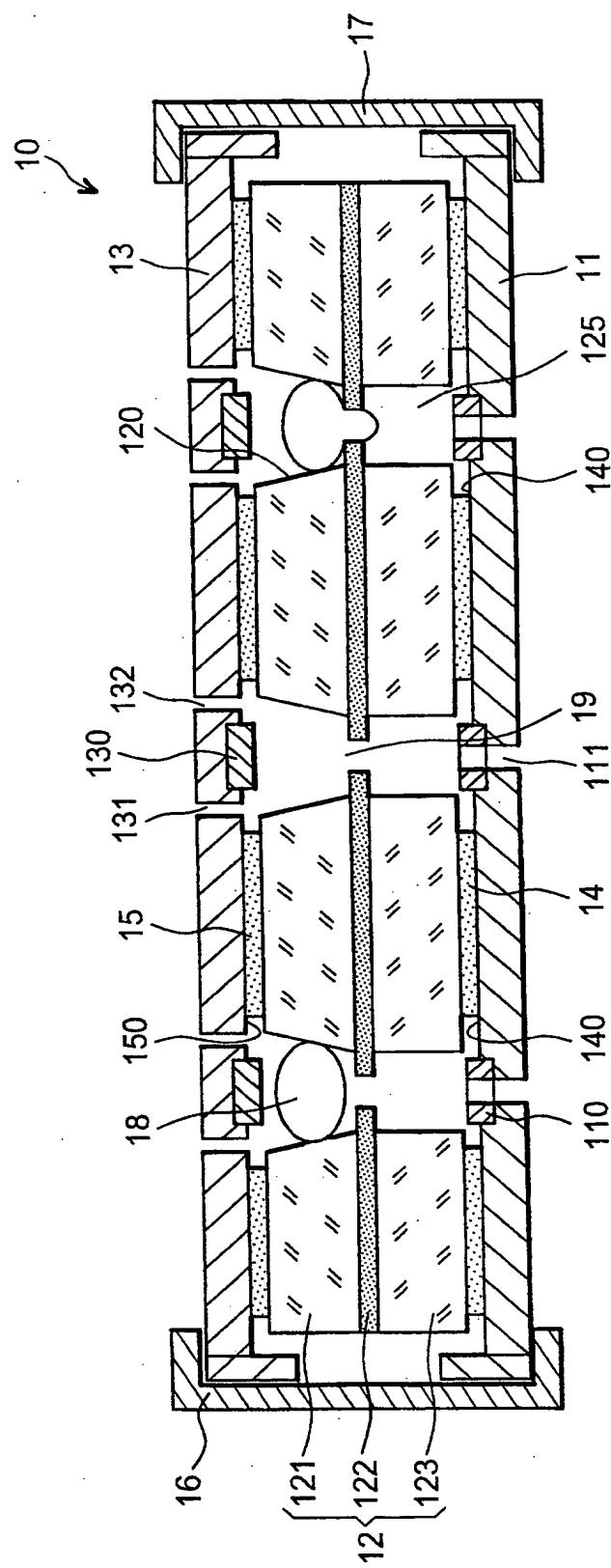


FIG. 2

3 / 4

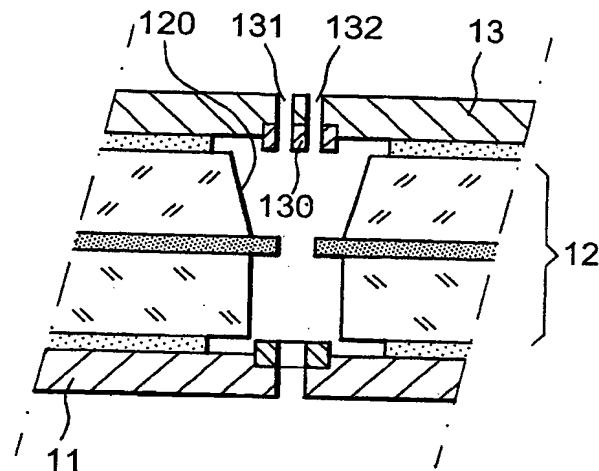


FIG. 3

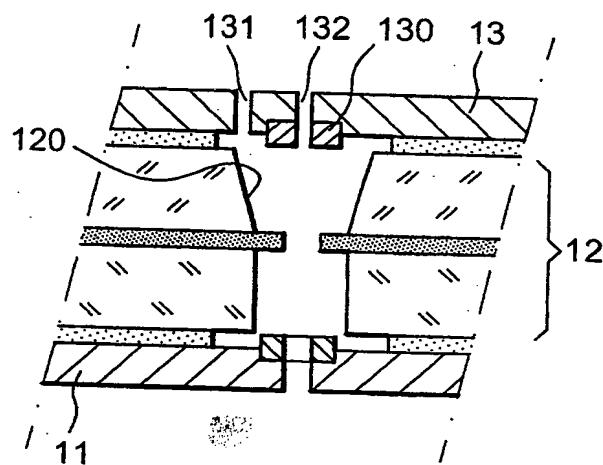


FIG. 4

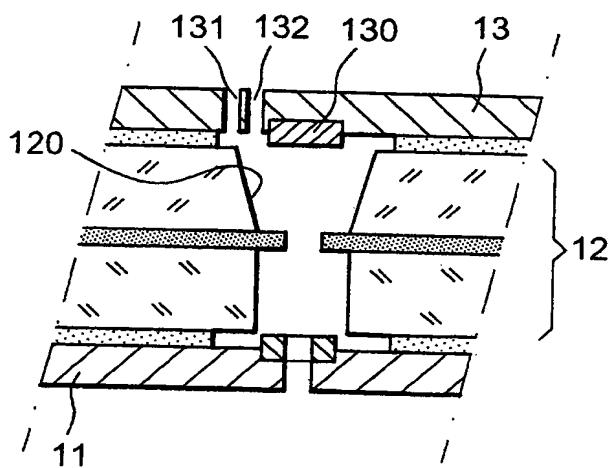


FIG. 5

4 / 4

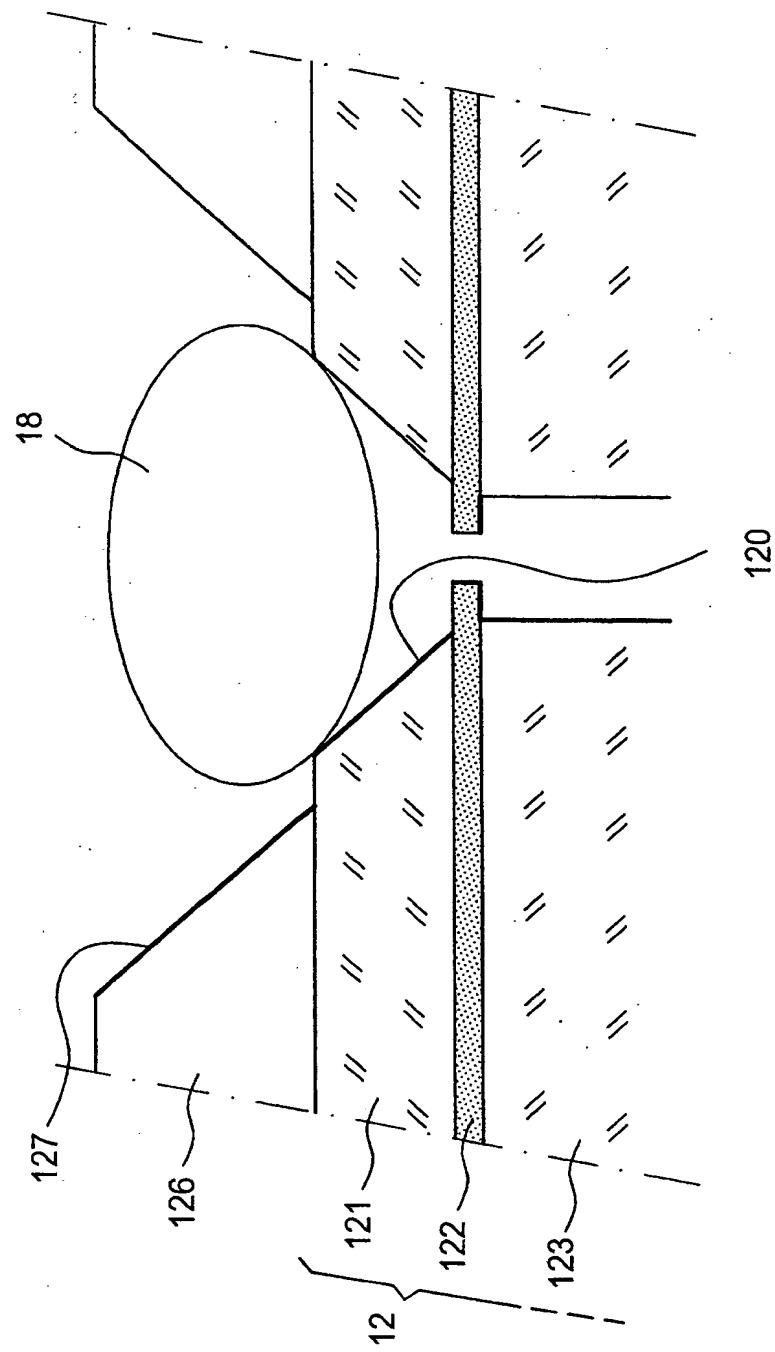


FIG. 6



## RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 621996  
FR 0210663

### DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)
X	WO 97 16726 A (CHIRON DIAGNOSTICS CORP ;SULLIVAN KEVIN J (US)) 9 mai 1997 (1997-05-09) * page 3, ligne 28 - page 5, ligne 26; figure 1 *	1	G01N33/487 C12M1/34 G01N33/50 G01N33/68
A	US 5 643 742 A (HUBER OSKAR WERNER ET AL) 1 juillet 1997 (1997-07-01) * abrégé * * colonne 4, ligne 1 - ligne 57; figures 1-3 *	1-27	
A	US 6 315 940 B1 (EGERT ULRICH ET AL) 13 novembre 2001 (2001-11-13) * abrégé * * colonne 5, ligne 52 - colonne 8, ligne 23; figures 1-3 *	1-27	
			G01N
1		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
		16 mai 2003	Kempf, G
<b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b>			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0210663 FA 621996**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 16-05-2003.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française.

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9716726	A	09-05-1997		AU 7327196 A DE 69621634 D1 DE 69621634 T2 EP 0858603 A1 WO 9716726 A1 US 6058934 A	22-05-1997 11-07-2002 19-09-2002 19-08-1998 09-05-1997 09-05-2000
US 5643742	A	01-07-1997		CA 2140892 A1 WO 9403583 A1 EP 0655086 A1 JP 3288378 B2 JP 8500438 T AU 7682491 A CA 2079897 A1 EP 0523148 A1 JP 5506098 T WO 9115595 A1	17-02-1994 17-02-1994 31-05-1995 04-06-2002 16-01-1996 30-10-1991 04-10-1991 20-01-1993 02-09-1993 17-10-1991
US 6315940	B1	13-11-2001		DE 19712309 A1 WO 9822819 A1 EP 0938674 A1 US 2002074227 A1	20-05-1998 28-05-1998 01-09-1999 20-06-2002